

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12P 7/42, C12N 1/20 // (C12P 7/42, C12R 1:01) (C12P 7/42, C12R 1:06) (C12N 1/20, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:01)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/32030 (43) 国際公開日 1997年9月4日 (04.09.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00378 (22) 国際出願日 1997年2月27日 (27.02.97) (30) 優先権データ 特願平8/69288 1996年2月29日 (29.02.96) JP 特願平8/346655 1996年12月10日 (10.12.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本曹達株式会社(NIPPON SODA CO., LTD.)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小林 洋一(KOBAYASHI, Yoichi)[JP/JP] 渡部 健(WATABE, Ken)[JP/JP] 大平 真人(OHIRA, Masato)[JP/JP] 早川 公一(HAYAKAWA, Koichi)[JP/JP] 〒250-02 神奈川県小田原市高田柳町345 日本曹達株式会社 小田原研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 東海裕作(TOKAI, Yusaku) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 日本曹達株式会社内 Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title: PROCESS FOR PREPARING α-HYDROXY ACIDS USING MICROORGANISM AND NOVEL MICROORGANISM (54) 発明の名称 微生物を用いた α -ヒドロキシ酸の製造方法及び新規微生物 (57) Abstract A process for preparing α -hydroxy acids represented by the general formula (II): $RCH(OH)COOH$ (wherein R represents a hydrogen atom, an optionally substituted C1-C6 alkyl group, an optionally substituted C2-C6 alkenyl group, an optionally substituted C1-C6 alkoxy group, an optionally substituted aryl group, an optionally substituted aryloxy group, or an optionally substituted heterocyclic group) by allowing a microorganism to act on α -hydroxy nitriles (I): $RCH(OH)CN$ (wherein R is as defined above) to hydrolyze and convert the α -hydroxy nitriles to α -hydroxy acids (II), wherein the α -hydroxy acids (II) are produced and accumulated in an aqueous solvent by a microorganism having the concentration resistance to the α -hydroxy nitriles (I) and/or α -hydroxy acids (II) and durability preferably in the presence of a cyanide, and harvested. According to this process, the use of the microorganism having the concentration resistance to the α -hydroxy nitriles (I) and/or α -hydroxy acids (II) and durability high enough to permit the activity to persist for a long period of time enables α -hydroxy acids (II) to be accumulated in high concentrations and cell bodies to be repeatedly used, and hence enables α -hydroxy acids (II) to be efficiently prepared. The addition of a cyanide to the reaction system results in more efficient preparation of α -hydroxy acids (II).		

(57) 要約

本発明は、 α -ヒドロキシニトリル [I] : $RCH(OH)CN$ (式中、R は (式中、R は水素原子、置換基を有してよいC1~C6のアルキル基、置換基を有してよいC2~C6のアルケニル基、置換基を有してよいC1~C6のアルコキシ基、置換基を有してよいアリール基、置換基を有してよいアリーロキシ基、又は置換基を有してよい複素環基を示す。) を、微生物の作用により加水分解して、 α -ヒドロキシ酸 [II] : $RCH(OH)COOH$ (式中、R は前記と同じ意味を表す。) に変換する α -ヒドロキシ酸 [II] の製造法において、好ましくは、シアン化物の存在下に、 α -ヒドロキシニトリル [I] 及び/又は α -ヒドロキシ酸 [II] に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物により、 α -ヒドロキシ酸 [II] を水性溶媒中に生成蓄積させ、これを採取することを特徴とする式 [II] で表される化合物の製造法である。

本発明によれば、 α -ヒドロキシニトリル [I] 及び/又は α -ヒドロキシ酸 [II] に対する濃度耐性及び活性が長時間持続する耐久性を有する微生物を用いることにより、 α -ヒドロキシ酸 [II] が高濃度に蓄積され、なおかつ菌体が一掃り返し使用できるので、効率的に α -ヒドロキシ酸 [II] を製造することが可能である。また反応系にシアン化物を添加することによりさらに効率的に α -ヒドロキシ酸 [II] を製造することが可能である。

特許としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
AN	アンゴラ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GR	ギリシャ	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BB	バハマ	IE	アイルランド	MD	モルドバ	SM	サンマリノ
BD	バングラデシュ	IL	イスラエル	ME	モンテネグロ	ST	サント・ペドロ・プリンセペ
BE	ベルギー	IN	インド	ML	マリ	TD	チャド
BF	ブルキナファソ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	JP	日本	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	KE	ケニア	MT	マルタ	UG	ウガンダ
BS	バハマ	KZ	カザフスタン	MX	メキシコ	US	アメリカ合衆国
BT	ブータン	LA	ラオス	NI	ニカラガ	UY	ウルグアイ
BZ	ベリーズ	LV	ラトヴィア	NL	オランダ	VN	ベトナム
CA	カナダ	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CC	ココス(キリング)諸島	LU	ルクセンブルグ	NZ	ニュージーランド		
CD	コンゴ民主共和国	LT	リトアニア	RO	ルーマニア		
CF	中央アフリカ共和国	LA	ラオス				
CG	コンゴ共和国	LV	ラトヴィア				
CH	スイス	LI	リヒテンシュタイン				
CI	コート・ジボワール	LT	リトアニア				
CK	クック諸島	LV	ラトヴィア				
CL	チリ	LI	リヒテンシュタイン				
CM	カメルーン	LT	リトアニア				
CN	中国	LV	ラトヴィア				
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン				
CR	コスタリカ	LT	リトアニア				
CU	キューバ	LV	ラトヴィア				
CY	キプロス	LI	リヒテンシュタイン				
CZ	チェコ	LT	リトアニア				
DE	ドイツ	LV	ラトヴィア				
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン				

明 細 書

微生物を用いた α -ヒドロキシ酸の製造方法及び新規微生物

技術分野：

本発明は微生物を用いて α -ヒドロキシニトリルを加水分解し、 α -ヒドロキシ酸を製造する方法に関する。 α -ヒドロキシ酸のうち乳酸は、食品、醸造用、工業用として、また2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸は家畜の飼料添加物として有用である。

背景技術：

α -ヒドロキシニトリル [1] から微生物によって α -ヒドロキシ酸 [11] を製造する方法として、例えば、

- (1) バチルス属、バクテリジウム属、マイクロコッカス属及びプレビバクテリウム属の微生物による乳酸、グリコール酸等の製造方法 [特公昭58-15120]、
- (2) コリネバクテリウム属に属する微生物による乳酸、グリコール酸及び2-ヒドロキシイソ酪酸の製造法 [特開昭61-56086]、
- (3) シュードモナス属、アースロバクター属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、コクリオバラス属、及びフザリウム属の微生物による乳酸、2-ヒドロキシイソ酪酸、2-ヒドロキシ-2-ヒドロキシフェニルプロピオン酸及びマンデル酸の製造方法 [特開昭63-222696]、
- (4) アースロバクター属、アスペルギルス属、バチルス属、バクテリジウム属、プレビバクテリウム属、コクリオバラス属、コリネバクテリウム属、マイクロコッカス属、ノカルディア属、ペニシリウム属、シュードモナス属及びフザリウムの微生物による、2-ヒドロキシ-3, 3-ジメチル-4-ブチロラク톤の製造法 [特開昭64-10996]、
- (5) ロドコッカス属、シュードモナス属、アースロバクター属及びプレビバクテリウム属の微生物による2-ヒドロキシイソ酪酸の製造法 [特開平4-40897]

WO 97/32030

(6) カセオバクター属、シュードモナス属、アルカリゲネス属、コリネバクテリウム属、プレビバクテリウム属、ノカルディア属、ロドコッカス属及びアースロバクター属の微生物による α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の製造法〔特開平4-40898〕、

(7) アルカリゲネス属、ロドコッカス属及びゴールドナ属の微生物による4-メチルチオ酪酸の製造法〔WO 96/09403〕、

(8) バントエア属、マイクロコッカス属及びバクテリヂウム属等の微生物による α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の製造法〔特開平8-173175〕等、

が知られている。

しかしながら、これら α -ヒドロキシ酸の製造方法は、目的とする物質を高濃度で生成蓄積させることにおいて必ずしも満足しうるものではない。例えば、乳酸は、コリネバクテリウム属に属する微生物により9.8重量%〔特開昭61-56086〕、シュードモナス属に属する微生物により10重量%〔特開昭63-222696〕、アースロバクター属に属する微生物により0.15重量%〔特開昭63-222696〕の蓄積が確認されているにすぎない。また、 α -ヒドロキシイソ酪酸はシュードモナス属に属する微生物により0.8重量%〔特開昭63-222696〕、 α -ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸はカセオバクター属に属する微生物により188 mM (2.8重量%)〔特開平4-40898〕、アースロバクター属に属する微生物により55 mM (0.8重量%)〔特開平4-40898〕、アルカリゲネス属に属する微生物により940 mM (14重量%)〔WO 96/09403〕の蓄積が各々確認されているにすぎない。

このように生成物の蓄積濃度が低い理由として、 α -ヒドロキシニトリルが水溶液中で対応するアルデヒドもしくはケトンと青酸に部分的に解離し〔ケミカルレビューズ (Chemical Reviews) 第42巻、189ページ、1948年〕、青酸によって酵素活性が阻害されることが挙げられる〔アグリカルチュラル バイオロジカル ケミストリー (Agricultural Biological Chemistry) 第46巻、1165ページ、1982年〕。また解離したアルデヒドの作用で酵素が短時間で失活する可能性も指摘されており、これを解決するための方法として、酸性亜硫酸イオンまたは亜ジチオン酸イオンを添加する方法〔特開平5-192189〕、亜リ

ン酸イオンまたは次亜リン酸イオンを添加する方法〔特開平7-213296〕が提案されている。しかしながらこれらの添加物を使用しても α -ヒドロキシ酸の生成蓄積濃度は高いものではない。

一般的に生成物の蓄積濃度が低い場合、これを製造するための設備が複雑かつ大規模になることは当業者によく知られている。このためこれらの方法によって工業的に α -ヒドロキシ酸を製造することは製造効率の点で問題があった。本発明は、微生物を用いて α -ヒドロキシ酸を高濃度に蓄積し効率的に α -ヒドロキシ酸を製造する方法を提供することを目的とする。

発明の開示：

本発明者らは、一般式〔I〕： $RCH(OH)CN$ （式中、Rは水素原子、置換基を有してよいC1～C6のアルキル基、置換基を有してよいC2～C6のアルケニル基、置換基を有してよいC1～C6のアルコキシル基、置換基を有してよいアリール基、置換基を有してよいアリールオキシ基、又は置換基を有してよい複素環基を示す。）で表される α -ヒドロキシニトリル〔I〕から、一般式〔II〕： $RCH(OH)COOH$ （式中、Rは前記と同じ意味を表す。）で表される α -ヒドロキシ酸〔II〕を生成する微生物について、高濃度の α -ヒドロキシニトリル〔I〕または α -ヒドロキシ酸〔II〕によって活性の抑制を受けにくく、長期間活性が持続する耐久性を有し、なおかつ高濃度の α -ヒドロキシ酸〔II〕を蓄積する能力を有する工業的に有利な微生物の探索を行った。

その結果、バリオボラクス属及びアースロバクター属に属する微生物に目的とする活性を見出した。さらに該反応系に、一般式〔III〕： $M_m(CN)_n$ （式中、Mは水素、アンモニウム又は金属イオンを表し、m、nは1～3の整数を表す。）で示されるシアン化物を添加することによって、酵素活性が改善されることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、 α -ヒドロキシニトリル〔I〕を微生物の作用により加水分解して、 α -ヒドロキシ酸〔II〕に変換する α -ヒドロキシ酸〔II〕の製造法において、 α -ヒドロキシニトリル〔I〕及び／又は α -ヒドロキシ酸〔II〕に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物により α -ヒドロキシ酸〔II〕を水

WO 97/32030

性溶媒中に生成蓄積させ、これを採取すること並びに該反応系にシアン化物を添加することを特徴とする α -ヒドロキシ酸 [11] の製造法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明で使用する微生物は、本発明の目的を達成する程度に α -ヒドロキシニトリル又は α -ヒドロキシ酸に対して濃度耐性を有するとともに長時間活性が持続する耐久性を有するものであれば特に制限はない。かかる微生物としては、バリオボラクス パラドキサス (*Variovorax paradoxus*) IAM12374 及びアースロバクター (*Arthrobacter*) NSSC104 (FERM P-15424) が挙げられる。これらの微生物のうち、バリオボラクス パラドキサス IAM12374 は東京大学分子細胞生物学研究所 (IAM) より容易に得ることができる。またアースロバクター NSSC104 は、本発明者らによって自然界から新たに分離され次の様に寄託されている。

受託番号: FERM BP-5829 (微工研菌寄第 P-15424 より移管)

寄託日: 1996年2月6日に国内寄託し1997年2月20日に国際寄託移管

寄託場所: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託機関: 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

又、アースロバクター NSSC104 の菌学的性質は以下の通りである。

形態	多形性桿菌
グラム染色性	+
rod-coccus サイクル	+
芽胞	-
運動性	-
細胞壁のジアミノ酸	リジン
酸素に対する態度	好氣的
オキシダーゼ	-
カタラーゼ	+
DNA の分解	+
ゼラチンの液化	+

WO 97/32030

PCT/JP97/00578

デンプンの分解	+
カゼインの分解	+
ビタミン要求性	-
グリコリル試験	- (アセチル型)
キノン系	MK-9 (H2)
細胞壁の糖組成	
ガラクトース	+
グルコース	+

以上の菌学的性質を、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) に基づいて検索した結果、NSSC104株はアースロバクター (Arthrobacter) 属に属する菌株と同定された。この菌株は上記寄託番号で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

次に、本発明の具体的な実施態様を述べる。

本発明に用いられる微生物の培養は、酵素誘導物質、微生物が資化する炭素源、窒素源、無機イオン、さらに必要ならば有機栄養源を含む通常の培地で行われる。酵素誘導物質としては、イソブチロニトリル等のニトリル化合物、 ϵ -カプロラクタムなどの環状アミド化合物等が使用される。炭素源としてはグルコース等の炭水化物、エタノール等のアルコール類、有機酸その他が適宜用いられる。窒素源としては、アミノ酸、硝酸塩、アンモニウム塩その他が用いられる。無機イオンとしては、リン酸イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、硫酸イオン、鉄イオン、その他が必要に応じて使用される。有機栄養源としては、ビタミン、アミノ酸など及びこれらを含むコーンステープリカー、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、その他が適宜用いられる。培養は好氣的条件下に、pH 6ないし9、温度25ないし37℃の適当な範囲に制御しつつ行えばよい。

本発明に用いられる微生物による加水分解反応は、上記のように培養した菌体を採取し、必要に応じて固定化菌体、粗酵素、固定化酵素等の菌体処理物を調製

WO 97/32030

し、水性溶媒中で α -ヒドロキシニトリル [I] と接触させることによって行われる。菌体又は酵素を固定化する場合は担体結合法、包括法等の通常行われる固定化技術を適用できる。粗酵素を調製する場合は、菌体を超音波、高圧ホモジナイザー等によって破碎した後に、硫酸塩析、クロマトグラフィー等の通常行われる酵素精製技術が適用できる。菌体は乾燥重量に換算して0.01~10重量%の濃度で使用され、反応終了後は濾過、遠心分離または限外濾過膜濃縮法によって回収されて繰り返し加水分解反応に使用できる。水性溶媒としては、水、緩衝剤等の塩類又は有機溶媒を含む水溶液が挙げられるが、これらは二相に分離していてもよい。

本発明で用いられる一般式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ で表される α -ヒドロキシニトリル [I] のRは、水素原子、置換基を有してよいC1~C6のアルキル基、置換基を有してよいC2~C6のアルケニル基、置換基を有してよいC1~C6のアルコキシル基、置換基を有してよいアリール基、置換基を有してよいアリールオキシ基、又は置換基を有してよい複素環基を示す。

具体的には、水素原子、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等のC1~C6アルキル基、

メチルチオメチル、1-メチルチオエチル、2-メチルチオエチル、1-メチルチオプロピル、2-メチルチオプロピル、3-メチルチオプロピル、1-メチルチオブチル、2-メチルチオブチル、3-メチルチオブチル、4-メチルチオブチル、6-メチルチオヘキシル、エチルチオメチル、1-エチルチオエチル、2-エチルチオエチル、1-エチルチオプロピル、2-エチルチオプロピル、3-エチルチオプロピル、1-エチルチオブチル、2-エチルチオブチル、3-エチルチオブチル、4-エチルチオブチル、プロピルチオメチル、1-プロピルチオエチル、2-プロピルチオエチル、1-プロピルチオプロピル、2-プロピルチオプロピル、3-プロピルチオプロピル、1-メチルチオイソプロピル、1-エチルイソプロピル、1-プロピルチオブチル、2-プロピルチオブチル、3-プロピルチオブチル、4-プロピルチオブチル、プロピルチオメチル、1-プロピルチオエチル、2-プロピルチオエチル、1-イソプロピルチオプロピル、2-

WO 97/32030

PCT/JP97/00578

ーイソプロピルチオプロピル、3-イソプロピルチオプロピル、1-イソプロピルチオブチル、2-イソプロピルチオブチル、3-イソプロピルチオブチル、4-イソプロピルチオブチル等のC1~C6アルキルチオC1~C6アルキル基、

ヒドロキシメチル、1-ヒドロキシエチル、2-ヒドロキシエチル、1-ヒドロキシプロピル、2-ヒドロキシプロピル、3-ヒドロキシプロピル、1-ヒドロキシブチル、1-ヒドロキシイソプロピル、2-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシブチル等のヒドロキシC1~C6アルキル基、

カルボキシメチル、2-カルボキシエチル、1-カルボキシエチル、3-カルボキシプロピル、2-カルボキシプロピル、1-カルボキシプロピル等のカルボキシC1~C6アルキル基、

カルバモイルメチル、1-カルバモイルエチル、2-カルバモイルエチル、1-カルバモイルプロピル、2-カルバモイルプロピル、3-カルバモイルプロピル等のカルバモイルC1~C6アルキル基、

メルカプトメチル、1-メルカプトエチル、2-メルカプトエチル、1-メルカプトプロピル、2-メルカプトプロピル、3-メルカプトプロピル等のメルカプトC1~C6アルキル基、

カルバミジノメチル、1-カルバミジノエチル、2-カルバミジノエチル、1-カルバミジノプロピル、2-カルバミジノプロピル、3-カルバミジノプロピル等のカルバミジノC1~C6アルキル基、

ベンジル、2-クロロベンジル、4-メチルベンジル、4-メトキシベンジル、3-ニトロベンジル、4-ヒドロキシベンジル、 α -メチルベンジル、 α 、 α -ジメチルベンジル等の置換基を有してもよいC1~C6アルキル基、

3-インドリルメチル、2-インドリルメチル、2-(3-インドリル)エチル、1-(3-インドリル)エチル、2-インドリルメチル、2-(2-インドリル)エチル、1-(2-インドリル)エチル、4-イミダゾメチル、2-イミダゾメチル、1-(4-イミダゾ)エチル、2-(4-イミダゾ)エチル等の複素環で置換されたC1~C6アルキル基、

ビニル、プロペニル、イソプロペニル、アリル、1-クロロアリル、2-クロロアリル、クロチル等の置換基を有してもよいC2~C6のアルケニル基、

WO 97/32030

メトキシ、エトキシ、プロポキシ、トリフルオロメトキシ等の置換基を有してよいC1~C6のアルコキシル基、

フェニル、2-クロロフェニル、p-トリル、3-ニトロフェニル、4-シアノフェニル、 α -ナフチル、 β -ナフチル等の置換基を有してよいアリール基、

フェニルオキシ、2-クロロフェニルオキシ、p-トリルオキシ、3-ニトロフェニルオキシ、 α -ナフチルオキシ、 β -ナフチルオキシ等の置換基を有してよいアリールオキシ基、

2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、5-クロロ-3-ピリジル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピロリル、3-ピロリル、2-フリル、3-フリル等の異種原子として、窒素、酸素、硫黄原子を少なくとも一種含む3~7員の複素環基を挙げることができる。

より具体的な α -ヒドロキシニトリル[1]としては、ラクトニトリル、マンデロニトリル、2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリル等が挙げられる。

これらの α -ヒドロキシニトリル[1]は、0.1~50重量%の濃度で反応に使用され、必要ならば反応の間逐次添加されてもよい。反応液のpHは適当な緩衝剤もしくは酸とアルカリによって5~11の間に保てばよい。反応の温度は4~50℃、好ましくは20~40℃に保てばよい。

本発明で用いられる一般式[III]で表されるシアン化合物としては、シアン化水素、シアン化ナトリウム、シアン化カリウム、シアン化カルシウム、シアン化マグネシウム、シアン化タリウム、シアン化アンモニウム等が挙げられる。シアン化物は、通常、0.4~1000mM、好ましくは4~500mMの範囲で使用され、必要ならば反応の間逐次添加されてもよい。

かくして6時間ないし120時間で添加された α -ヒドロキシニトリル[1]に対応する α -ヒドロキシ酸[11]がアンモニウム塩として15重量%以上の高濃度で蓄積される。反応に用いた菌体は、実質的な活性低下なしに、繰り返し加水分解反応に使用することができる。

生成物は、濃縮、抽出などの常法によって分離精製することができ、必要ならば酸性条件下での有機溶媒抽出、熱分解等によってアンモニアと分離することが

WO 97/32030

PCT/JP97/00578

できる。生成物である α -ヒドロキシ酸 [11] としては、乳酸、マンデル酸、2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸などが挙げられる。

発明を実施するための最良の形態：

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に述べる。

(実施例1)

0.3%肉汁、0.5%ペプトン及び0.5%食塩を含む培地2mlを試験管に、下記の組成の培地20mlを100ml容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、各々121℃で15分間滅菌した。バリオボラクス パラドキサス 1A M12374株を2mlの試験管に一白金耳接種し、30℃で一晩振盪培養した後、0.2mlをバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに3日間30℃で振盪培養した。この培養液を遠心分離して得られた菌体を生理食塩水で洗浄し、乾燥重量に換算して1.0重量%の菌体を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁した。次に2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度160mMになるように添加し、30℃で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加後12時間毎に同量の2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを9回繰り返し追加し、総計120時間の反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSK gel ODS-80TM、キャリア:アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=20/80/0.1)を用いて定量した結果、25重量%の2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アンモニウム塩の蓄積を確認した。(収率98%)

酵母エキス	0.5%
グリセロール	0.5%
リン酸一カリウム	0.1%
リン酸二カリウム	0.1%
食塩	0.02%

WO 97/32030

硫酸マグネシウム 7 水塩	0.02%
ϵ -カプロラクタム	0.5%
pH	7.2 (2 N 苛性ソーダで調整)

(実施例 2)

0.3%肉汁、0.5%ペプトン及び0.5%食塩を含む培地 2 ml を試験管に、下記の組成の培地 20 ml を 100 ml 容量のバッフル付き三角フラスコに入れ、各々 121°C で 15 分間滅菌した。アースロバクター NSSC 104 株を 2 ml の試験管に一白金耳植菌し、30°C で一晚振盪培養した後、0.2 ml をバッフル付き三角フラスコに植え継ぎ、さらに 5 日間 30°C で振盪培養した。この培養液を遠心分離して得られた菌体を生理食塩水で洗浄し、乾燥重量に換算して 0.6 重量%の菌体を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。次にラクトニトリルを終濃度 124 mM になるように添加し、30°C で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加後 5 時間毎に同量のラクトニトリルを 20 回繰り返し追加し総計 100 時間の反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる乳酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー (カラム: TSK gel ODS-80 TM、キャリア: アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸 = 5/95/0.1) を用いて定量した結果、23 重量%の乳酸アンモニウム塩の蓄積を確認した。(収率 93%)

コーンスチープリカー	1.0% (別滅菌)
スクロース	1.0% (別滅菌)
リン酸一カリウム	0.1%
リン酸二カリウム	0.1%
食塩	0.02%
硫酸マグネシウム 7 水塩	0.02%
硫酸第一鉄	0.001% (別滅菌)
ϵ -カプロラクタム	0.5%
pH	7.2 (2 N 苛性ソーダで調整)
	1.0

(実施例 3)

実施例 2 と同様にして調製したアースロバクター NSSC104 株菌体を乾燥重量に換算して 4 重量% になるように 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。次に 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを終濃度 200 mM になるように添加し、30℃ で緩やかに振盪しながら加水分解反応を行った。添加後 1 時間毎に同量の 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを 7 回繰り返し追加し、さらに 1.5 時間毎に 8 回追加して総計 19 時間の反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を実施例 1 と同様に定量した結果、4.9 重量% の 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸アンモニウム塩の蓄積を確認した。(収率 96%)

(実施例 4)

実施例 2 と同様にして調製したアースロバクター NSSC104 株菌体を乾燥重量に換算して 3.2 重量% になるように蒸留水に懸濁した。次に 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを、菌体乾燥重量 1 g 当たり 0.46 g/hr の添加速度で連続的に添加し、0.5 M アンモニア水で pH 7.4~7.6 に調整しながら 30℃ で 20 時間の加水分解反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を回収した。回収された菌体を 40 倍重量の蒸留水で 3 回洗浄した後、1 回目と同量の蒸留水に再懸濁し、2 回目の反応に用いた。2 回目の反応、菌体回収及び菌体洗浄も 1 回目と同様に行った。このような反応の反復を 10 回行い、各反復回毎の遠心上清に含まれる 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を実施例 1 と同様に定量した。結果を以下に示す。

反応の反復 (回目)	2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸 アンモニウム塩蓄積濃度 (重量%)	収率 (%)
1	36.1	96
3	36.3	97
5	36.4	97
7	36.4	97
10	36.0	96

WO 97/32030

(実施例 5)

実施例 2 と同様にして調製したアースロバクター NSSC104 株菌体を乾燥重量に換算して 5 重量% になるように、0.1 M シアン化ナトリウム水溶液に懸濁した。次に 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを連続的に添加し、pH コントローラーで pH 7.4 ~ 7.6 に調整しながら 30 °C で 10 時間の加水分解反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる乳酸の濃度を実施例 2 と同様に定量した。比較としてシアン化ナトリウム無添加の場合の反応もおこなった。結果を以下に示す。

	乳酸アンモニウム塩 生成量 (重量%)
無添加	20.5
0.1 M NaCN	40.0

(実施例 6)

実施例 2 と同様にして調製したアースロバクター NSSC104 株菌体を乾燥重量に換算して 5 重量% になるように、0.1 M シアン化カリウム水溶液に懸濁した。次に 2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを連続的に添加し、pH コントローラーで pH 7.4 ~ 7.6 に調整しながら 30 °C で 10 時間の加水分解反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる 2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を実施例 1 と同様に定量した。比較としてシアン化カリウム無添加の場合の反応もおこなった。結果を以下に示す。

	2-ヒドロキシ-4-メチルチオ 酪酸アンモニウム塩生成量 (重量%)
無添加	26.6
0.1 M KCN	41.7

(実施例 7)

実施例 2 と同様にして調製したアースロバクター NSSC104 株菌体を乾

燥重量に換算して5重量%になるように、40 mMシアン化水素水溶液に懸濁した。次に2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルを連続的に添加し、pHコントローラーでpH 7.4~7.6に調整しながら30℃で10時間の加水分解反応を行った。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を実施例1と同様に定量した。比較としてシアン化水素無添加の場合の反応もおこなった。結果を以下に示す。

	2-ヒドロキシ-4-メチルチオ 酪酸アンモニウム塩生成量(重量%)
無添加 40 mM HCN	27.2 44.5

(参考例)

特開平4-40898に記載されている培養方法並びに加水分解の方法によって、アースロバクターNSSC104株の培養とその触媒反応を行なった。

(1) 培地(単位: W/V)

グリセロール	2%
酵母エキス	0.3%
リン酸一カリウム	0.68%
リン酸二ナトリウム	0.71%
硫酸ナトリウム	0.28%
塩化マグネシウム	0.04%
塩化カルシウム	0.004%
硫酸マンガン	4×10 ⁻⁴ %
塩化鉄	6×10 ⁻⁵ %
硫酸亜鉛	3×10 ⁻⁵ %
寒天	1.8%
α-クロロプロピオニトリル	0.05%
pH	7.5

WO 97/32030

(2) 培養条件

斜面培地から1白金耳の菌体を採り、蒸気寒天平板培地に塗布し、30℃で48時間好氣的に培養した。

(3) 加水分解反応

寒天平板培地から菌体を採取し、遠心分離によって菌体を0.05Mリン酸緩衝液(pH7.5)で3回洗浄した。沈殿菌体をOD630が2.5になるように1.5mLの同様の緩衝液に再懸濁し、終濃度100mMの2-ヒドロキシ-4-メチルチオプロニトリルを添加し、25℃で20時間、振とうしながら反応を行なった。反応終了後、反応液を遠心分離して菌体を除去し、遠心上清に含まれる2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー(カラム:TSK gel ODS-80TM、キャリア:アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸=20/80/0.1)を用いて定量した。2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸の濃度は0.01mMだった。

アースロバクターHR4株は、上記の培養方法並びに加水分解反応において5mMの2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸を蓄積したことが、特開平4-40898号に記載されている。したがって、アースロバクターNSSC104株はアースロバクターHR4株とは明らかに異なる菌株である。

(発明の効果)

本発明によれば、 α -ヒドロキシニトリル[1]及び/又は α -ヒドロキシ酸[11]に対する濃度耐性並びに活性が長時間持続する耐久性を有する微生物を用いることにより、 α -ヒドロキシ酸[11]が高濃度に蓄積され、なおかつ菌体が続り返し使用できるので、効率的に α -ヒドロキシ酸[11]を製造することが可能である。また反応系にシアン化物を添加することによりさらに効率的に α -ヒドロキシ酸[11]を製造することが可能である。

産業上の利用の可能性:

以上説明したように、本発明は、 α -ヒドロキシニトリル[1]及び/又は α

ーヒドロキシ酸 [11] に対する濃度耐性並びに活性が長時間持続する耐久性を有する微生物を用いることにより、 α -ヒドロキニトリルから α -ヒドロキシ酸 [11] を工業的に有利に得る製造法である。従ってその産業的意義は大きい。

請 求 の 範 囲

1. 式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ (式中、Rは水素原子、置換基を有してよいC1～C6のアルキル基、置換基を有してよいC2～C6のアルケニル基、置換基を有してよいC1～C6のアルコキシル基、置換基を有してよいアリール基、置換基を有してよいアリールオキシ基、又は置換基を有してよい複素環基を示す。) で表される化合物を微生物の作用により加水分解して、式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物に交換する製造法において、式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物及び/又は式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物により、式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物を水性溶媒中に生成蓄積させ、これを採用すること特徴とする、式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物の製造法。

2. Rが水素原子、置換基を有してもよいC1～C6のアルキル基又は置換基を有してもよいフェニル基である請求項1記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

3. Rが水素原子、C1～C6のアルキルチオアルキル基、C1～C6のヒドロキシアルキル基又はフェニル基である請求項1又は2記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

4. 式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ で表される化合物が、ラクトニトリル、マンデロニトリル又は2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルからなる群から選ばれる一種である請求項1記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

5. 式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ で表される化合物及び/又は式 [II] : RC

H(OH)COOHで表される化合物に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物がバリオボラクス (Variovorax) 属に属するものである請求項1ないし4のいずれかに記載の式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物の製造法。

6. 式 [I] : RCH(OH)CN で表される化合物及び／又は式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物がアースロバクター (Arthrobacter) 属に属するものである請求項1ないし4のいずれかに記載の式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物の製造法。

7. 式 [I] : RCH(OH)CN で表される化合物及び／又は式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物に対する濃度耐性及び耐久性を有する微生物がアースロバクター (Arthrobacter) NSSC104である請求項1ないし4又は6のいずれかに記載の式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物の製造法。

8. アースロバクター (Arthrobacter) 属に属し、式 [I] : RCH(OH)CN (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物及び／又は式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物に対する濃度耐性及び耐久性を有し、式 [I] : RCH(OH)CN (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物を式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物に変換する能力を有するNSSC104株。

9. 式 [I] : RCH(OH)CN (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物を微生物の作用により加水分解して、式 [II] : RCH(OH)COOH で表される化合物 (式中、Rは前記と同一の意味を示す。) で表される化合物を製造するに際し、該反応系に、一般式 [III] : Mm(CN)n (式中、Mは水素、アンモニウム又は金属イオンを表し、m、nは1-3の整数を表

WO 97/32030

PCT/JP97/00578

す。)で示されるシアン化物を存在させることを特徴とする式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

10. Rが水素原子、置換基を有してもよいC1~C6のアルキル基又は置換基を有してもよいフェニル基である請求項9に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

11. Rが水素原子、C1~C6のアルキルチオアルキル基、C1~C6のヒドロキシアルキル基又はフェニル基である請求項9又は10に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

12. 式 [I] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{CN}$ (式中、Rは前記と同一の意味を示す。)で表される化合物が、ラクトニトリル、マンデロニトリル及び2-ヒドロキシ-4-メチルチオブチロニトリルからなる群から選ばれる一種である請求項9に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

13. 微生物がバリオボラクス (Variovorax) 属に属するものである、請求項9に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

14. 微生物がアースロバクター (Arthrobacter) 属に属するものである請求項9に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

15. 微生物がアースロバクター (Arthrobacter) NSSC104である請求項9に記載の式 [II] : $\text{RCH}(\text{OH})\text{COOH}$ で表される化合物の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12P7/42, C12N1/20 // (C12P7/42, C12R1:01), (C12P7/42, C12R1:06), (C12N1/20, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P7/42, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-213296, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), August 15, 1995 (15. 08. 95) & EP, 666320, A2	1 - 15
A	JP, 5-192189, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), August 3, 1993 (03. 08. 93) & EP, 486289, A2	1 - 15
A	JP, 4-99497, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), March 31, 1992 (31. 03. 92) & EP, 473328, A2	1 - 15
A	JP, 4-40898, A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), February 12, 1992 (12. 02. 92) (Family: none)	1 - 15
A	JP, 63-222696, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), September 16, 1987 (16. 09. 87) (Family: none)	1 - 15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understate the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 22, 1997 (22. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

June 3, 1997 (03. 06. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/00578

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P7/42, C12N1/20 //

(C12P7/42, C12R1:01), (C12P7/42, C12R1:06), (C12N1/20, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12P7/42, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 7-213296, A (日東化学工業株式会社) 15, 8月, 1995 (15.08.95) &EP, 666320, A2	1-15
A	JP, 5-192189, A (日東化学工業株式会社) 3, 8月, 1993 (03.08.93) &EP, 486289, A2	1-15
A	JP, 4-99487, A (日東化学工業株式会社) 31, 3月, 1992 (31.03.92) &EP, 473328, A2	1-15
A	JP, 4-40898, A (日東化学工業株式会社) 12, 2月, 1992 (12.02.92) (ファミリーなし)	1-15
A	JP, 63-222696, A (出光興産株式会社) 16, 9月, 1987 (16.09.87) (ファミリーなし)	1-15

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.05.97

国際調査報告の発送日

03.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明昭

印

4B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)